Rickettsia prowazekii 及び Rickettsia typhi の濾過実験

北岡正見 山地幸雄

國立予防衛生研究所

[受付: 1 月 23 日, 1951 年]

Rickettsia とは濾過性病毒と一般細菌との中間に位置する微生物の一群である。このものは最近 Bengtson¹⁾により更に Rickettsia, Coxiella, 及び Cowdria の3群に分類された。そのうち Coxiella は一般細菌を通過せしめない濾過管を容易に通過する²⁾しかし Rickettsia のうち発疹チフスの病原体である Rickettsia prowazekii (以下 R. P. と略称) 並びに発疹熱の病原体である R. typhi (以下 R. t. と略称) が上述の濾過管を通過する可否が異論があり陰性(Ricketts³⁾, Olitsky⁴⁾⁵⁾⁶⁾, 草間⁷⁾), 凝陽性(Nicolle), 或は陽性(Nicolle, Hach⁸⁾, Lépine⁹⁾ Bruynoghe¹⁰⁾)とも言はれた。Zinsser¹¹⁾によれば, Rは原則として非濾過性である。しかし時に Berkefeld V を通過するがNを通過しないと述べ、笠原¹²⁾, Topping¹³⁾はN及びVを通過するを報告した。恙虫病の病原体である R. orientalis (Bergey¹⁴⁾)は R. tsutsugamushi と記載しているが著者は Sadusk¹⁴⁾の記載の如く R. orientalis が正しいと考えている)に就ても同様の問題(陰性, 長興¹⁵⁾, 陽性, 林¹⁶⁾)があつた。之等濾過実験の報告を読む際には、濾過材料が果してRを濃厚に含んでいたか、濾過管が完全であつたか又濾過操作が適当であつたか、一應検討を加えるべきである。

昭和19年著者はマウス肺累代移植¹⁷⁾した R. t. の乳剤を用ひ濾過実験を行ひ、R. t. は Berkefeld V. ならびにNを通過するがWを通過しないと成績を得た。しかし今次大戦末期の國內状況から一時実験を中止した。昭和24年には卵黄囊内累代移植系¹⁸⁾¹⁹⁾ R. p. 並びに R. t. の両株を用ひ再び濾過実験を行つてみた。その目的はRは果して非濾過性のものであるか、或は或細菌に於て認められている如く、Rにも濾過型が存在するかを、電子顕微鏡(木村²⁰⁾)によらず、物理的濾過操作によつて再検討するためである。且つまた濾過によつて汚染材料からRの純粋分離可能か否かをみることも出来る。

実験方法: 濾過試験を行うには、従来感染猿、或はモルモットの血液或は睾丸莖膜乳剤が屢々用ひられたが、ここでは多数のRを含む濾過材料を準備するため感

染マウス肺乳剤或は感染卵黄囊乳剤を用ひた。即ち R. t. 腹腔内被接種マウスの脾、肝、大網等の混合乳剤をエーテル麻醉を施したマウスの鼻腔内に少くとも4滴~5滴を滴下し、この操作を少くとも3回反覆し、2~3日を経て呼吸困難の症状を呈したり或は瀕死のマウスを解検し、肺に肺炎所見があり、而も塗抹標本に於てRが純培養の程度に無数に見出された肺を滅菌砂と共に磨碎し、pH 7.4 のハートレイ・ブイオンに健康家兎血清を20~30%の割合に加えた液で10%乳剤を作り、2000 r.p.m. 10~15分間遠心し、その上清を以て濾過材料とした。

卵黄囊乳剤を以つて濾過実験を行うには39°C に7日間孵化した雞卵を用ひ、Cox法によりRを卵黄囊内に接種し、次いで35~36°C に5~9日間培養し、割卵し、卵黄囊を採り出し、塗抹標本に於て無数のRの見出されるものを集め、pH 7.4~7.8 の生理食塩水或は牛肉汁水を以て10%の乳剤を作り、之を2500 r.p.m. 15~20分間遠心し、その上清を以て濾過試験を行つた。時には卵黄囊乳剤の凍結乾燥株の100倍稀釈液をも使用した。

使用濾過管はドイツ製 Berkefeld V, N, W 及び Seitz E.K. 層、和製松風 N.V. を使用した。之等の濾過管は予め靈菌、時には球菌を以て、濾過試験の前後2回に亘り濾過を行ひ、濾過管に破損のない事を確めた。

濾過はロータリー真空ポンプを用ひ、陰圧10~20cm水銀柱の下で行はれた。濾過時間は3~5分、時には10分を要した。濾過材料として遠心上清10~20ccを用ひ少くとも5ccの濾液を集めた。濾過に先立つて凡20%の血清添加 pH 7.4 のブイオンを予め通し、而る後被検材料を濾過した。昭和24年の濾過実験には卵白を25%に添加した食塩水を、塩酸を以て pH 5.6~5.8 に修正し、その液を以て濾過管を前処置した事もあるが、この前処置の行はれなかつた場合もある。濾過は16~25°C

KITAOKA, Masami, YAMAGI, Satio; The National Institute of Health of Japan

第 1 表

実験 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
濾 過 管	V	V	V	N	N	N	W	W	W
濾 過 前	+	+	+	+	+	+	+	+	+
初 代	+	—	—	—	—	—	—	—	—
2 代		±	—	±	—	—	—	—	—
3 代		+	—	±	—	—	—	—	—
4 代			—	+	—	—	—	—	—

±: 粘稠な腹腔滲出液を認めるが、塗抹標本に R を認めない

の室温に於て行はれた。

濾過陽性、陰性の判定。濾過をマウス、ラッテ、モルモット或は雞卵に接種し、モルモットに於ては発熱及び脳のチフス結節の有無、また恢復期には血清の補体結合反応が検査された。発熱モルモットは次代移植が行はれた。マウス、ラッテでは腹腔滲出液の有無、その塗抹標本、更にラッテの睾丸莖膜、卵黄嚢及びマウス肺の塗抹標本が作られ、検鏡上 R の陽性並に次代移植可能かな否か検査した。但し材料接種後マウスに於て 3~7 日を経ても何等の異常が認められなかつた場合は、動物を致死せしめ、盲目累代 3~4 代に及んだ。雞卵に於ても同様盲目累代が行はれた。

濾過実験に使用した株は昭和 19 年には北里研究所より分與を受けたマウス腹腔累代 R.t. 北研株、昭和 24 年には卵黄嚢累代移植株で、R.t. の代表株である Wilmington 株 (以下 W 株と略称) 及び R.p. の代表株である Breinl 株 (以下 B 株と略称) である。W 株と B 株の 2 株は米國 National Institute of Health から分與を受けたものである。

実験成績: 昭和 19 年 5~6 月に於ける R. t. の濾過には、感染マウス肺の遠心上清が用ひられた。濾過管はドイツ製及び Berkefeld V, N, 及び W で、予め葡萄球菌を以つて破損していないことが試験された。濾過は室温で行はれ、濾液はマウス腹腔内に注射された。

V, N, W 夫々に於て 3 列の実験が行はれたが V の 1 列は初代の濾注接種マウスに於て、塗抹標本上 R が、他の 1 列は 2 代目マウスの腹腔内に滲出液が次で 3 代目マウスに於て R が証明され、また累代可能であつた。他の 1 列は盲目累代移植 4 代に及んだが陰性に終つた。N の 3 列のうち 1 列は 2 代目マウスの腹腔内に滲出液が現はれ盲目累代 4 代に於て漸く R が証明されたが他の 2 列は陰性に終つた。W の 3 列は悉く陰性となつた (第 1 表)。

即ち R.t. 感染マウス肺乳剤は V を、時には N を通過

するが W を通過しないとの成績になつた。

昭和 24 年 6~10 月にわたり、W 株感染卵黄嚢の 10% 乳剤の遠心上清を以て松風濾過管 N 及び V の濾過試験を行つた。濾過管は菌嚢を以て試験された。濾過は室温で行はれ、濾液はラッテの腹腔、時には孵化雞卵内及びマウスの腹腔内に接種された。罹患の判定は塗抹標本で R を検出すること及び累代移植試験によつた。

2 列の V の実験に於て、1 列は初代で、他の 1 列は 2 代で R が証明された。3 列の N の実験のうち、1 列はラッテ 2 代まで、他の 1 列はラッテ並に雞卵に夫々 2 代並に 3 代まで累代したが R を証明する事は出来なかつた。この N の濾過に於て濾過管の蛋白前処置が施されていなかつたので、N 濾過管を蛋白で前処置し、経鼻感染マウス肺乳剤の濾過を試みた処、初代マウス腹腔塗抹標本に於て R が証明され累代可能であつた。1 列の Seitz 濾過実験は卵黄嚢移植 2 代に及んだが、陰性に終つた。即ち W 株感染卵黄嚢乳剤の V 通過は可能であるが、N の通過は困難の様である (第 2 表)。然しマウス肺乳剤は前回と同様 N をも通過した。然し R が Seitz E. K. 層を通過するとの確証があげられなかつた。

R.p. の代表である B 株感染卵黄嚢乳剤を以て同じ條件の下に濾過試験を行つた。2 列の V のうち、1 列はモルモット累代 2 代に及んだが発症が認められなかつた。他の 1 列は雞卵内に累代し、初代に於て R が少数に認められた。9 列の N 濾過に於て 1 列はラッテ次いでモルモットに累代移植したが陰性、2 列はモルモット 2 代移植したが陰性、1 列は雞卵 5 代に及んだが陰性、他の 1 列は雞卵初代に於て少数の R が証明され、又 1 列はモルモット 2 代目に於て定型的に発症し、累代可能であつた。濾過管を前処置した 2 列は、初代モルモット肺の病理組織学的所見でチフス結節が認められ、補体結合反応も R.p. に対し特異的に陽性であつた。前処置した濾過管を以て B 株感染マウス肺乳剤の濾過試験を行つた 1 列では次代経鼻感染マウス肺に R が見出された。即ち B 株は、感染卵黄嚢乳剤に於て、濾過管を前処置しなくても V を、時には N を通過する。然し、濾過管を前処置すれば N をよりよく通過する様である。B 株経鼻感染マウス肺乳剤は W 株に於けると同様、N を通過する。

考 按

R.t. である北研株と W 株、また R.p. である B 株等を以て濾過試験を行つた。濾過に際しては細心の注意が拂はれた (Ward²⁰) が、多くの報告者 (Nicolle, Hach, Bruinoghe, Lépine, 笠原, Topping) が記載していると同様に濾過管に何等の破損が認められなくとも V、時に

第 2 表

實驗 No.	實驗日	濾 過 材 料	濾 過		繼 代	成 績	
			Berkefeld 型	時間			
1	1949 1/VI	W株 Y.S. 8 日, 10 倍乳劑	V	5分	ラツテ 1 代	塗抹標本	R(+)
2	4/VI	W " 7 日, "	V	3	ラツテ 2 代	"	R(+)
3	4/VI	W 同 上	N	3	同 上	"	R(-)
4	12/VI	W 同 上	N	10	鶏 卵 ラツテ 2 代	"	R(-)
5	6/X	W 肺, 10 倍乳劑	N(蛋白前處置)	3	マウス腹腦 1 代	"	R(+)
6	23/VII	W Y.S. 5 日, 10 倍乳劑	Seitz E. K.	4	鶏 卵 2 代	"	R(-)
7	3/VI	B株 " 6 日, "	V	3	モルモット 2 代	發 熱	(-)
8	7/VI	B Y.S. 乾燥株100倍乳劑	V	3	鶏 卵 2 代	塗抹標本 R	(少數)
9	2/VI	B Y.S. 7 日, 10 倍乳劑	N	3	ラツテ→モルモット	發 熱	(-)
10	3/VI	B 同 上	N	3	モルモット 2 代	"	(-)
11	5/VIII	B 同 上	N	3	モルモット 2 代	"	(-)
12	20/VII	B Y.S. 保存株, 10倍乳劑	N	10	鶏 卵 5 代	塗抹標本	R(-)
13	7/VI	B Y.S. 乾燥株, 100倍乳劑	N	3	鶏 卵 2 代	"	R(少數)
14	3/VIII	B Y.S. 8 日, 10 倍乳劑	N	4	鶏 卵 4 代 モルモット 3 代	モルモット 1, 2, 3 代發症	
15	26/VIII	B " 9 日, "	N(蛋白前處置)	4	モルモット 1 代	補體結合反應	R.p. (+)
16	1/IX	B 同 上	N(")	10	モルモット 1 代	補體結合反應 腦チフス結節	R.p. (+) (+)
17	23/X	B 肺, 10 倍乳劑	N(")	10	マウス經鼻 2 代	塗抹標本	R(+)

Y.S. 8 日: 8 日培養感染卵黃囊
肺: 經鼻感染マウス肺

Y.S. 乾燥株: 感染卵黃囊凍結乾燥株

Y.S. 保存株: 感染卵黃囊ドライアイスボックス保存株

はNを通過する事が明かにされた。濾液内の毒力が測定されていないため何程濾過するかは数値的に示されないが、陰性の場合を考慮すれば、容易に通過するとは考えられない。但しW並に Seitz E. K 層を通過するとの確証は挙げられなかつた。この際濾過材料がマウス感染肺乳剤の方が感染卵黄乳剤の方よりもよりよく通過する様である。又濾過管を血清或は卵白を以て前処置した場合も、殊にW株に於て、よりよく通過する。

濾過の判定は専らRの検出と累代移植可能によつた。発熱、病理組織変化、補體結合反應は参考にとどめた。その理由は單に濾液のみでも病変が起るとの Olitzky²¹⁾, Otto²²⁾, 矢部²³⁾の報告があるからである。

上述のN濾液を 7000 r.p.m 1 時間高速心し、その沈澱物を Macchiavello 並に Giemsa 染色を施し、鏡檢すれば、極めて微細なR様小体が少数認められ、Rにも微細な濾過型があるものと解される。笠原も指摘し、我々も屢々経験している如く、鏡檢上Rの見出されない材料でも極めて強毒のこともあり、またこの場合累代によつて再びRを検出し得るに至ること等を考慮すれば、上記

可視染色のものの他に不染色不可視の濾過型の存在の可能性は大きいのである。他方に於て電子顯微鏡像よりRの濾過型の存在が裏づけされている(木村)。

また汚染されたR被檢材料を Berkefeld V 或はNで濾過する事によりRを純分離する事も可能であるが、Penicillin, Streptomycin 其他の抗菌性物質の見出される現在に於て、簡單でない濾過試験を強ひて行うよりは被檢材料に抗菌性物質を添加し雑菌を抑制すべきであろう。

むすび

R. prowazekii の代表株である Breinl 株、並に R. typhi の代表株である Wilmington 株(両株は卵黄囊累代系)の卵黄囊乳剤、或は經鼻感染マウス肺乳剤に就て更に R. typhi 北研株(マウス腹腔累代系)の經鼻感染マウス肺乳剤に就ても pH 7.4~7.8 の食塩水、牛肉汁水、或は血清加ハートレイ・ブイオンを以て夫々 10% 稀釈液を作り、2,000~2,500 回轉 10~20 分間遠心し、その上清を以てドイツ製 Berkefeld V, N, W, Seitz E. K. 層、和製松風 N.V. の濾過試験を行ひ、次の様な成

績を得た。

北研株に於ては、V 3 列中 2 列に、N 3 列中 1 列に、W 3 列中零に濾過試験が陽性であつた。Wilmington 株に於ては V 2 列中 2 列、N 3 列中 1 列、Seitz E. K. 1 列中零に陽性、Breinl 株に於ては V 2 列中 1 列、N 9 列中 5 列に陽性が挙げられた。即ち *R. prowazekii* 並 *R. typhi* は濾過性病毒に比すれば、著しく容易でないが Berkefeld V を時には N を通過する。然し W 並に Seitz E. K. は通過したとの確証は挙ごらなかつた。濾過に際し被検材料が卵黄囊乳剤よりもマウス肺乳剤の方が、又 Wilmington 株に於ては濾過管を卵白或は血清を以て前処置した方が、R はより良く通過した。濾過に際し陰圧 10~20 cm 水銀柱、温度は 16~28°C であつた。濾過の前と後の 2 回にわたり葡萄状球菌或は霊菌を以て濾過管の破損のない事が確められた。濾過陽性の判定は濾液をマウス、ラッテ、モルモット或は雞卵に累代移植し、専ら R の検鏡、累代移植可能か否かによつた。モルモットの発熱、脳のチフス結節、補体結合反應等は参考にとどめた。

(本研究は文部省科学研究費によつた)

文 献

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: 7th edition 1083~1099, 1948.
- 2) Davis, G. E. and Cox, H. R.: Publ. Health. Rep., 53, 2259~2267, 1938.
- 3) Ricketts, H. T., and Wilder, R. M.: J. A. M. A., 54, 463~467, 1910.
- 4) Olitsky, P. K.: J. Inf. Dis., 20, 349~356, 1917.
- 5) Olitsky, P. K.: J. Exp. Med., 35, 469~473,

- 1922.
- 6) Olitsky, P. K.: J. Exp. Med., 35, 121~126, 1922.
- 7) 草間滋: 日本病理学会々誌. 9, 272~274, 1919.
- 8) Hach, I. W.: Z. Hyg. Infek., 106, 221~231, 1926.
- 9) Lépine, P.: Ann. de l'Institut. Pasteur., 51, 290~376, 1933.
- 10) Bruynoghe, R. et Jadin, J.: Soc. Biol., 113, 1522~1523, 1933.
- 11) Zinsser, H. and Batchelder, A. P.: J. Exp. 51, 847~858, 1930.
- 12) Kasahara, S., Yoshida, S. and Okamoto, Y.: Kitasato Arch. Exp. 143~161, 1938.
- 13) Topping, N. H., Bengtson, I. A., Shear, M. J. and Henderson, B. G.: National Institute of Health Bulletin. 183, 13~28, 1945.
- 14) Blake, F. G., Maxcy, K. F., Sadusk, J. F., Kohls, G. M. and Bell, E. G.: Am. J. Hyg., 41, 246~270, 1945.
- 15) 長興又郎, 宮川米次, 三田村篤四郎, 田宮猛雄: 日本病理学会々誌 9, 263~267, 1919.
- 16) 林直助, 加藤敏郎, 加藤隆夫: 日本病理学会々誌. 27, 596~599, 1937.
- 17) Castaneda, M. R.: Amer. J. Path., 15, 467~475, 1935.
- 18) Cox, H.: Pub. Health. Rep., 53, 2241~2247, 1938.
- 19) 北岡正見: 医学のあゆみ. 1, 317~332, 1946.
- 20) 木村康, 東昇: 第 20 回日本細菌学会発表. 1947.
- 21) Otto, R. und Dietrich: Zbl. Bakter. I Abt. Orig., 82, 383~400, 1919.
- 22) 矢部専之助: 細菌学雑誌. 273, 341~345, 1918.
- 23) Ward, H. K. and Tang, F.: J. Exp. Med., 49, 1~4, 1929.